

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

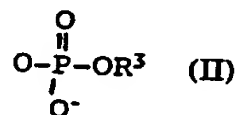
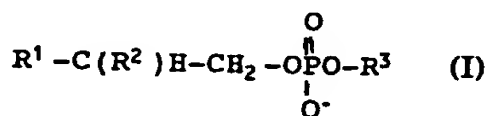
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : <b>C07F 9/09, A61K 31/66</b> <b>C07F 9/117</b></p>	<b>A1</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 94/09014</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>28. April 1994 (28.04.94)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP93/02762</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>8. Oktober 1993 (08.10.93)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 42 34 130.2      9. Oktober 1992 (09.10.92)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstrasse 10, D-37073 Göttingen (DE).</b></p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : <b>EIBL, Hansjörg [DE/DE]; Heinrich-Deppe-Ring 22, D-37120 Bovenden-Edigehausen (DE). MASSING, Ulrich [DE/DE]; Lange Geismarstrasse 12, D-37073 Göttingen (DE). UNGER, Clemens [DE/DE]; Herzberger Landstrasse 2b, D-37085 Göttingen (DE).</b></p>		
<p>(74) Anwälte: <b>WEICKMANN, H. usw. ; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München 86 (DE).</b></p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b></p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>		

(54) Title: **PURE ENANTIOMERS OF PHOSPHORIC-ACID ESTERS AS PHOSPHOLIPASE-A2 INHIBITORS**

(54) Bezeichnung: **ENANTIOMERENREINE PHOSPHORSAUREESTERN ALS PHOSPHOLIPASE A2-INHIBITOREN**



**(57) Abstract**

The invention concerns compounds of the general formula (I), in which R<sup>1</sup> is a C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub> alkyl group, R<sup>2</sup> is an O-CO-R<sup>4</sup>, NH-CO-R<sup>4</sup>, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NHCH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl<sup>-</sup> group, R<sup>4</sup> is a C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alkyl group and R<sup>3</sup> is one of the following groups: -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>H(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>, pentahydroxycyclohexanyl derivatives, in particular myo-inositol derivatives, 1,2- or 2,3-(R or S)-dihydroxypropanyl, seryl (D or L), N-methylseryl (D or L), N,N-dimethylseryl, (D or L), N,N,N-trimethylseryl (D or L), H, methyl, ethyl, hydroxyethyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxypropyl, R<sup>2</sup> and (II) being interchangeable with each other, plus enantiomers thereof.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft neue Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wobei R<sup>1</sup> ein C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylrest bedeutet, R<sup>2</sup> ein O-CO-R<sup>4</sup>, NH-CO-R<sup>4</sup>, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NHCH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl<sup>-</sup> bedeutet, R<sup>4</sup> ein C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-Alkylrest ist und R<sup>3</sup> für einen der folgenden Reste steht: -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>H(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>, Pentahydroxycyclohexanyl-, insbesondere myo-Inositolderivate, 1,2- oder 2,3- (R oder S)-Dihydroxypropanyl-, Seryl (D oder L)-, (N-Methyl)-Seryl (D oder L)-, (N,N-Dimethyl)-Seryl (D oder L)-, (N,N,N-Trimethyl)-Seryl (D oder L)-, H-, Methyl-, Ethyl-, Hydroxyethyl-, 3-Hydroxypropyl-, 2-Hydroxypropyl, wobei R<sup>2</sup> und (II) auch miteinander vertauschbar sind, sowie deren Enantiomeren.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	CN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CJ	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakischen Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TG	Togo
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

- 1 -

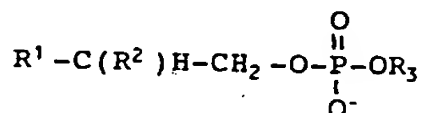
# ENANTIOMERENREINE PHOSPHORSAUREESTERN ALS PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub>-INHIBITOREN.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue enantiomerenreine Phosphoverbindungen, die eine inhibitorische Wirkung auf die enzymatische Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> aufweisen und ein Verfahren zu ihrer Herstellung, sowie pharmazeutische Zubereitungen, die solche Inhibitoren enthalten.

Die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ist ein Enzym, welches die sn-2-Acylobindung von Phospholipiden spaltet. Dieses Enzym ist daher an der Bildung einer großen Anzahl von biologische Reaktionen auslösenden Stoffen beteiligt, und zwar insbesondere bei der Bildung von Arachidonsäure und von Lysophospholipiden. Aus der Arachidonsäure werden durch enzymatische Oxidation eine Vielzahl biochemisch wirksamer Verbindungen gebildet, die unter dem Begriff Eicosanoide zusammengefaßt werden, wozu auch die Prostagladine, Tromboxane, Prostazykline und Leukotriene gehören. Diese verschiedenen Verbindungsklassen rufen eine Vielzahl von biochemisch wichtigen Reaktionen hervor. Aus diesem Grund sind Inhibitoren von PLA<sub>2</sub> für die Entwicklung neuer entzündungshemmender oder auch die Blutgerinnung beeinflussender Arzneimittel von großem Interesse. Die Erfindung hat daher zum Ziel, Inhibitoren für PLA<sub>2</sub> bereitzustellen.

Diese Ziele werden erfindungsgemäß durch die Bereitstellung einer Gruppe von Phosphorsäureestern mit der allgemeinen Formel



erreicht, worin  $R^1$  einen Alkylrest mit 10 bis 22 C-Atomen bedeutet,  $R^2$  gleich  $-OH$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OC_2H_5$ ,  $-OC_3H_7$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHCH_3$ ,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-N^+(CH_3)_3Cl^-$ ,  $-O-C(O)R^4$  oder  $-NH-C(O)R^4$  bedeutet, wobei  $R^4$  für einen Alkylrest mit 1 - 20 C-Atomen steht und  $R^3$  eine der folgenden Gruppen darstellt:

$-C_2H_4-N^+(CH_3)_3$ ,  $-C_2H_4-N^+H(CH_3)_2$ ,  $-C_2H_4-N^+H_2CH_3$ ,  $-C_2H_4-N^+H_3$ , Pentahydroxycyclohexanyl-, insbesondere myo-Inositolderivate, 1,2- oder 2,3-(R oder S)-Dihydroxypropanyl-, Seryl (D oder L)-, (N-Methyl)-Seryl (D oder L)-, (N,N-Dimethyl)-Seryl (D oder L)-, (N,N,N-Trimethyl)-Seryl (D oder L)-, H-, Methyl-, Ethyl-, Hydroxyethyl-, 3-Hydroxypropyl-, 2-Hydroxypropyl. Bei den erfindungsgemäßen Verbindungen sind

$R^2$  und  $O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O^-}{\mid}}{P}}-OR^3$  gegeneinander vertauschbar. Bei den erfin-

dungsgemäßen Substanzen kann das den Rest  $R^2$  tragende C-Atom sowohl in der R- als auch in der S-Konfiguration vorliegen. Der Alkylrest  $R^1$  kann sowohl gesättigte als auch ungesättigte Kohlenstoffbindungen aufweisen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist  $R^1$  ein  $C_{11}$ - bis  $C_{22}$ - und insbesondere ein  $C_{16}$ - bis  $C_{18}$ -Alkylrest, wobei ein Hexadecylrest besonders bevorzugt ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist  $R^4$  ein  $C_1$ - $C_{17}$ -Alkylrest.

Je nach der Bedeutung von  $R^3$  handelt es sich also bei den erfindungsgemäßen Verbindungen um Phosphocholine, Phosphoethanolamine, Phospho-(N-methyl)-ethanolamine, Phospho-(N,N-dimethyl)-ethanolamine, Phosphoinositole (D oder L), Phosphoglycerine (D oder L), Phosphoserine (D oder L), Phospho-(N-Methyl)-serine (D oder L), Phospho-(N,N-Dimethyl)-serine (D oder L), Phospho-(N,N,N-Trimethyl)-serine (D oder L), Phosphoglykole, Phosphatidsäuren, Methylphosphate, Ethylphosphate, 1,3-Propandiolphosphate und 1,2-Propandiolphosphate.

Die neuen Verbindungen sind weiterhin auch Arzneimittel zur Bekämpfung von Tumoren sowie von Protozoen- und Pilz-erkrankungen. Sie sind ebenfalls geeignet zur Therapie von Autoimmunerkrankungen und von Knochenmarksschädigungen.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung solcher Phosphatidylverbindungen durch Umsetzen von

- Isopropyliden-Glycerinaldehyd mit einer Triphenylphosphinalkylbromid-Verbindung mittels einer Wittigreaktion,
- einer Hydrierung und Deacetonierung des so erhaltenen Produktes auf an sich bekannte Weise, anschließender
- Tritylierung des hydrierten und deacetonierten Produktes zur entsprechenden O-Tritylhydroxy-Verbindung,
- Benzylisierung der O-Tritylhydroxy-Verbindung und Detritylierung zum entsprechenden Hydroxy-O-Benzylzwischenprodukt und

Weiterverarbeitung des Zwischenproduktes entweder dadurch, daß man es

- durch Phosphorylierung zur entsprechenden Phospho-O-Benzylverbindung mit anschließender Debenzylierung zum entsprechenden O-Phospho-Hydroxy-Produkt, insbesondere einem O-Phosphorsäureester oder O-Phosphorsäurediester mit freier 2-Hydroxylgruppe umsetzt,
- oder daß man das Zwischenprodukt durch eine
- Phthalimideinführung unter Konfigurationsumkehr und anschließender Detritylierung zur entsprechenden Hydroxy-N-Phthalimido-Verbindung umsetzt, die dann mittels einer Phosphorylierung auf an sich bekannte Weise in die entsprechende Phospho-N-Phthalimido-Verbindung umgesetzt wird, welche dann durch Phthalsäureabspaltung in das gewünschte O-Phospho-Amino-Produkt, insbesondere ein O-Phosphorsäureester- oder O-Phosphorsäurediester-Amino-Produkt überführt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird z.B. das Phosphocholin-Amino-oder Phosphocholin-Hydroxy-Produkt mit einem den Rest  $R^4$  enthaltenden Acelierungsmittel zum entsprechenden O-Phospho-N-Acyl- oder O-Phospho-O-Acyl-Produkt umgesetzt.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind bezüglich ihrer Enantiomeren rein. Da die  $PLA_2$  enantioselektiv arbeitet, kann mittels dem erfindungsgemäßen Verfahren gezielt das gewünschte Enantiomer oder auch eine Mischung der Enantiomere zur  $PLA_2$ -Modulation eingesetzt werden. Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen Substanzen, die eine lange aliphatische Kette aufweisen (z.B. die Octadecanderivate), sehr gut in Zellen eindringen können, um dort ihre Wirkung zu entfalten. Besonders geeignet sind dabei Verbindungen, die eine kurze Acylkette aufweisen. Überraschenderweise zeigen diejenigen erfindungsgemäßen Substanzen, die eine unnatürliche Konfiguration aufweisen und/oder die die freie Amino- bzw. Hydroxylfunktion im Molekül enthalten, besonders ausgeprägte inhibitorische Wirkung.

In den im folgenden angeführten Reaktionsschemata A bis D sind die Verfahren zur Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen zusammengefaßt.

#### Syntheseweg A

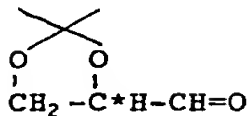
Das Reaktionsschema veranschaulicht die Darstellung der 1-Phospho-2-Esterverbindungen. Da die Einführung der Acylgruppe im letzten Schritt der Synthese - Ag - erfolgt, dürfen die polaren Phosphorsäureester-Gruppen keine freien Hydroxyl- oder Aminogruppen beinhalten.

Ausnahme: Sind die Zielverbindungen jedoch Substanzen mit einer freien 2-Hydroxylgruppe, die durch die Reaktionsfolge

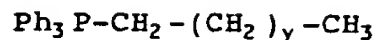


- 5 -

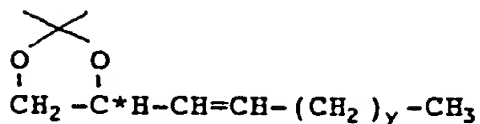
Aa - Af erhalten werden können, dann gilt obige Einschränkung nicht.



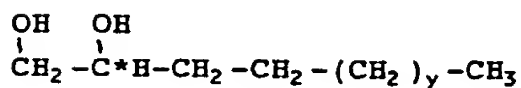
+



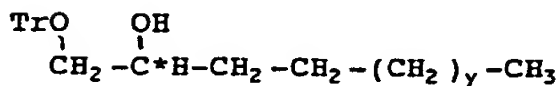
↓ a) Wittigreaktion / Kettenaufbau



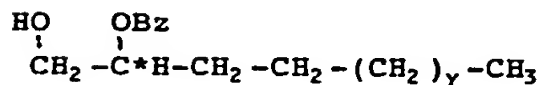
↓ b) Hydrierung / Deacetonierung



↓ c) Tritylierung

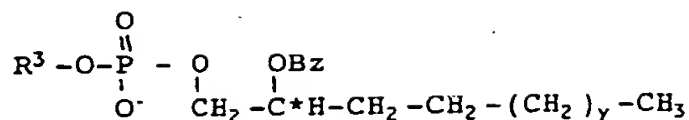


↓ d) Benzylierung / Detritylierung

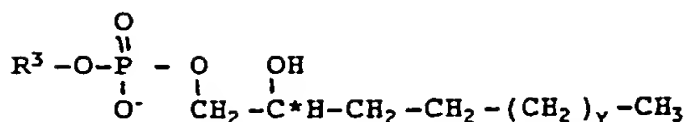


↓ e) Phosphorylierung

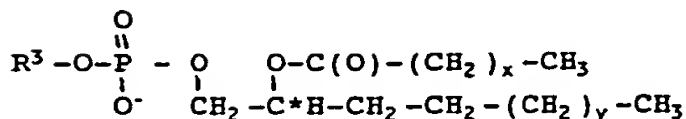
- 6 -



↓ f) Debenzylierung



↓ g) Acylierung



Hierbei bedeutet \*, daß das C-Atom in der R- oder S-Konfiguration vorliegt, aber auch racemisch sein kann. Dies kann durch die entsprechende Auswahl der Edukte erreicht werden.

y bedeutet eine Zahl von 7 bis 19,

x bedeutet eine Zahl von 0 bis 19.

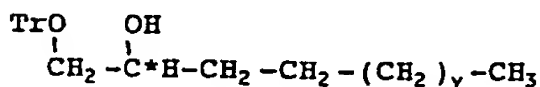
Zur Synthese der 2-Phospho-1-Esterverbindungen wird der Syntheseweg auf folgende Weise modifiziert: Anstelle der Phosphorylierung Ae wird das entsprechende Zwischenprodukt in 1-Position acyliert, die Hydroxylgruppen in 2-Position durch katalytische Hydrogenolyse freigesetzt und dann in 2-Position phosphoryliert.

Syntheseweg B

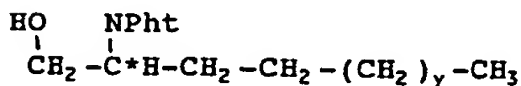
Das Reaktionsschema beschreibt die Darstellung von 1 Phospho-2-Amidverbindungen. Da die Einführung der Acylgruppe im letzten Schritt der Synthese - Bg - erfolgt, dürfen die polaren Phosphorsäureester-Gruppen keine freien Hydroxyl- oder Amino-Gruppen enthalten.

Ausnahme: Sind die Zielverbindungen Substanzen mit einer freien 2-Aminogruppe, die durch die Reaktionsfolge Ba - Bf erhalten werden können, dann entfällt obige Einschränkung.

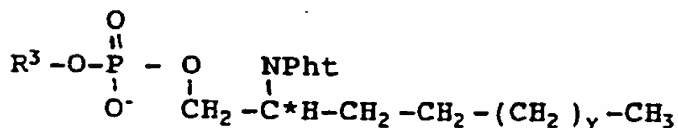
Die Syntheseschritte Ba) - Bc) entsprechen den Syntheseschritten Aa) bis Ac)



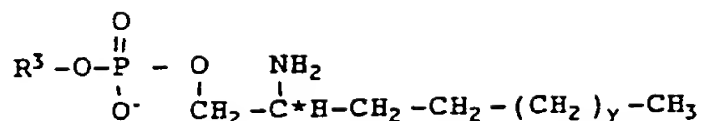
↓ d) Phthalimideinführung / Detritylierung



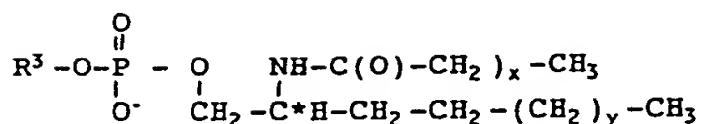
↓ e) Phosphorylierung



↓ f) Phthalsäureabspaltung



↓ g) Acylierung

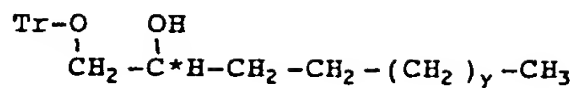


\*, x und y haben die bei Syntheseweg A angegebene Bedeutung.

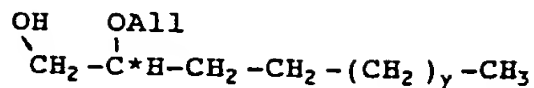
Zur Synthese der 2-Phospho-1-Esterverbindungen wird der Syntheseweg auf folgende Weise modifiziert: Anstelle der Reaktion Ae wird die freie Hydroxylgruppe in der 1-Position des entsprechenden Zwischenprodukts durch die Reaktionsfolge Mesylierung und Substitution durch Ammoniak in die 1-Aminoverbindung umgewandelt, die dann acyliert wird. Durch Debenzylierung in der 2-Position und Freilegung der Hydroxylgruppe kann jetzt die Phosphorylierung in 2-Position erfolgen.

### Syntheseweg C

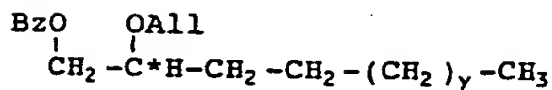
Das Schema beschreibt die Darstellung der 1-Phospho-2-Ester-Verbindungen. Im Unterschied zu A erfolgt die Einführung der Fettsäure - Cg - vor der Phosphorylierung - Ci. Damit können Zielverbindungen hergestellt werden, die im polaren Bereich freie Hydroxyl- oder Aminogruppen tragen, z.B. Phosphoethanolamin, Phosphoglycerin usw. Die Syntheseschritte Ca - Cc entsprechen den Reaktionen Aa - Ac.



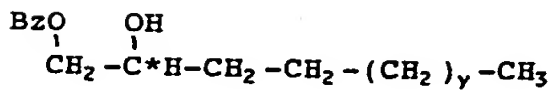
↓ d) Allylierung / Detritylierung



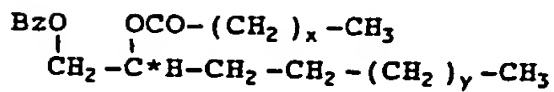
↓ e) Benzylierung



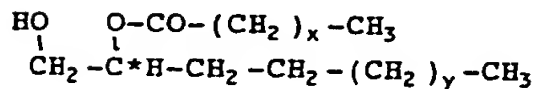
↓ f) Allyletherspaltung



↓ g) Acylierung

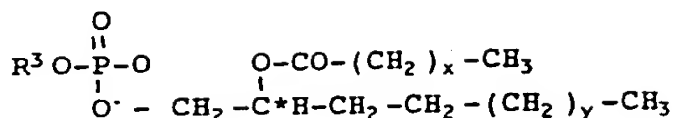


↓ h) Debenzylierung



↓ i) Phosphorylierung

- 10 -



\*, x und y haben die bei Syntheseweg A angegebene Bedeutung.

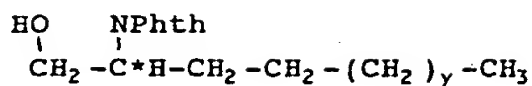
Zur Synthese a) der 2-Phospho-1-Hydroxyverbindungen und b) der 2-Phospho-1-Aminoverbindungen wird obiger Syntheseweg auf folgende Weise modifiziert:

- a) Anstelle der Reaktionsschritts Cg wird in 2-Position phosphoryliert und zum Endprodukt mit freier 1-Hydroxylgruppe debenzyliert;
- b) anstelle des Reaktionsschritts Ce wird die 1-Hydroxylgruppe nach Mitsunobu (Mitsunobu O., M. Wada und T. Sano, Stereospecific and stereoselective reactions. I. Preparation of amines from alcohols. J. Am. Chem. Soc. 94, 679-680 (1972); Mitsunobu O., The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. Synthesis 1981, 1-28) in eine N-Phthalimidgruppe überführt. Nach Abspaltung der Allylschutzgruppe in 2-Position wird phosphoryliert. Die Aminogruppe in der 1-Position wird durch reduktive Abspaltung des Phthalsäurerests freigesetzt.

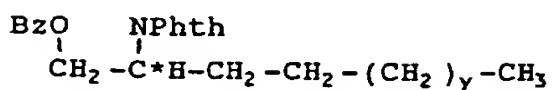
#### Syntheseweg D

Dieses Reaktionsschema ist zur Darstellung von 1-Phospho-2-Amidverbindungen geeignet. Im Unterschied zu - B - erfolgt die Amidbildung - Dg - vor der Phosphorylierung - Di. Damit können auch Verbindungen dargestellt werden, die im polaren Bereich Hydroxyl- oder Aminogruppen tragen, z.B. Phosphoethanolamin, Phosphoglycerin usw. Die Syntheseschritte Da - Dd entsprechen den Reaktionen Ba - Bd.

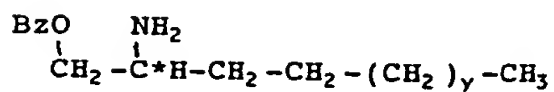
- 11 -



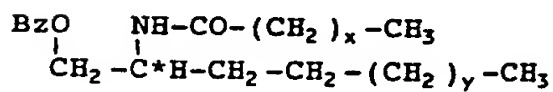
↓ e) Benzylierung



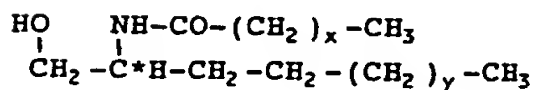
↓ f) Phthalsäureabspaltung



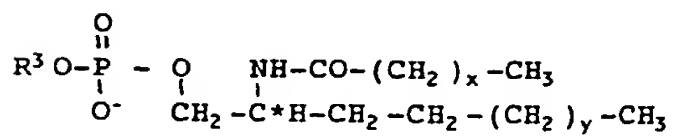
↓ g) Acylierung



↓ h) Debenzylierung



↓ i) Phosphorylierung



\*, x und y haben die bei Syntheseweg A angegebene Bedeutung.

Beispiele für die inhibitorische Wirkung der Substanzen sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1:

Inhibitorische Wirkung von 1-O-Phosphocholin-2-(-Tabelle)-octadecanen auf das System DPPC/PLA2

R-Konfiguration		S-Konfiguration	
Inhibitor	Inhibition	Inhibitor	Inhibition
(10 %)	(%)	(10 %)	(%)
(C-2-Ester)	73	(C-2-Ester)	0
(C-12-Ester)	0	(C-12-Ester)	30
(C-16-Ester)	58	(C-16-Ester)	89
(C-18/1-Ester)	0	(C-18/1-Ester)	0
(C-18-Ester)	54	(C-18-Ester)	59
(Hydroxyl)	39	(Hydroxyl)	100
(C-2-Amid)	100	(C-2-Amid)	0
(C-12-Amid)	98	(C-12-Amid)	79
(C-16-Amid)	95	(C-16-Amid)	77
(C-18/1-Amid)	77	(C-18/1-Amid)	27
(C-18-Amid)	90	(C-18-Amid)	81
(Amin)	39	(Amin)	33



Tabelle 2:

Inhibitorische Wirkung von 1-O-Phosphocholin-2-(-Tabelle)-octadecanen auf das System PAF/PLA2

R-Konfiguration		S-Konfiguration	
Inhibitor (10 %)	Inhibition (%)	Inhibitor (10 %)	Inhibition (%)
(C-2-Ester)	40	(C-2-Ester)	0
(Hydroxyl)	0	(Hydroxyl)	24
(C-2-Amid)	100	(C-2-Amid)	63
(Amin)	0	(Amin)	40

Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zubereitungen, die die erfindungsgemäßen Substanzen enthalten.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

Beispiel 1:Wittigreaktion/Kettenaufbau A oder B, a:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1.2-Isoproyliden-octadec-3-en

0.1 mol Triphenylphosphin-pentadecan-bromid werden in 400 ml THF gelöst. Man kühlt auf 0°C und spritzt 0.12 mol n-Butyllithium (2.5 M in Hexan) langsam in die Reaktionslösung. Nach 10 Minuten Rühren bei 0°C kühlt man auf -78°C ab. 0.12 mol Isopropylidenglycerinaldehyd (Lit: Hubschwerlen und Fischer) in 50 ml THF werden innerhalb von 30 Minuten zutropft. Nach dem Zutropfen wird noch 20 Minuten bei -78°C gerührt und anschließend die Kühlung entfernt. Man läßt über

Nacht rühren. Es wird gegen 350 ml Wasser extrahiert, die untere Phase wird nochmals gegen 50 ml Diisopropylether extrahiert. Die org. Phasen werden im Vakuum abgedampft und der Rückstand in 350 ml Pentan aufgenommen. Unter starkem Rühren kühlt man auf 0°C ab. Vom Rückstand wird abgesaugt und mit 150 ml Pentan nachgewaschen. Das Filtrat extrahiert man mit 120 ml konz. NaCl-Lsg., dampft die Lösungsmittel der org. Phasen im Vakuum ab, nimmt den Rückstand in 20 ml Hexan auf und trennt das apolare Nebenprodukt durch eine Säulenfiltration mit Hexan an 160 g Kieselgel ab. Anschließend wird das Produkt mit Hexan/Diisopropylether eluiert. Man gewinnt das Produkt durch sorgfältiges Abdestillieren der Lösungsmittel im Vakuum.

Ausbeute: 0.076 mol = 76 %

M = 324.549 g/mol ( $C_{21}H_{40}O_2$ )

$R_f$  = 0.49 (Hexan/Diisopropylether (4:1))

$[\alpha]_D(R)$  = -4.60 (Reine Substanz)

$[\alpha]_D(S)$  = +4.60 (Reine Substanz)

Analyse: ber.: C = 77.71 H = 12.42

gef.: C = 77.98 H = 12.56

### Beispiel 2:

#### Hydrierung/Deacetonierung A oder B, b:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1.2-Octadecandiol

Zu 0.1 mol 1.2-Isopropyliden-octadec-3-en in 800 ml THF wird 18 g Pd/C (10 %ig) in 18 ml Wasser zugegeben. Bevor man das Reaktionsgefäß an eine Hydrierapparatur anschließt, leitet man 20 Minuten einen Stickstoffstrom durch die Reaktionsmischung. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme (12-24 Stunden) wird über einen Membran- oder Glasfaserfilter der Katalysator abgesaugt. Zum Filtrat werden 120 ml 2 N HCl gegeben und eine Stunde bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird mit 900 ml Kaliumcarbonatlsg. (40 g/l) extrahiert. Die

- 15 -

wässrige Phase wird wiederum mit 300 ml THF extrahiert, die org. Phasen vereinigt und die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Durch Zugabe von Toluol wird das enthaltene Wasser azeotrop abdestilliert. Lösungsmittel- und Wasserspuren werden durch Trocknung im Vakuum beseitigt.

Ausbeute: 0.097 = 97 %

M = 286.50 g/mol ( $C_{18}H_{38}O_2$ )

$R_f$  = 0.19 (Chloroform/Methanol 20:1)

$R_f$  (Zwischenprodukt) = 0.50 (Hexan/Diisopropylether 4:1)

$R_f$  (Edukt) = 0.56 (Hexan/Diisopropylether 4:1)

Analyse: ber.: C = 73.21 H = 9.98 N = 4.10

gef.: C = 73.10 H = 10.25 N = 4.25

### Beispiel 3:

#### Tritylierung A oder B, c:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Trityl-2-hydroxy-octadecan

Zu 0.1 mol 1.2-Octadecandiol in 260 ml Toluol wird 0.15 mol Triethylamin gegeben. Es wird auf Siedetemperatur erhitzt und 0.115 mol Tritylchlorid in 125 ml Toluol werden in 10 Minuten eingetropft. Man läßt eine Stunde unter Rückfluß kochen. Vom Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert. Den Rückstand gibt man in 550 ml konz. NaCl-Lsg./Kaliumcarbonatlsg. (40 g/l) (1:1) und extrahiert mit 550 ml Diisopropylether. Die org. Phase wird gegen 210 ml konz. NaCl-Lsg./Kaliumcarbonatlsg. (40 g/l) (10:1) extrahiert. Über mit Kaliumcarbonat basisch eingestelltes Kieselgel (80 g) wird die org. Phase säulenfiltriert. Man eluiert vollständig mit weiteren 350 ml Diisopropylether (+ 0.5 ml Triethylamin) und dampft die Eluate im Vakuum ab. Aus 550 ml Pentan wird zwei Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$  kristallisiert. Das Produkt kristallisiert in feinen Nadeln. Die Trocknung erfolgt über KOH im Vakuum.

- 16 -

Ausbeute: 0.09 mol = 90 %

M = 528.821 g/mol ( $C_{37}H_{52}O_2$ )

$R_f$  = 0.70 (Diethylether/Pentan 1:1)

$R_f$  (Edukt) = 0.09 (Diethylether/Pentan 1:1)

Beispiel 4:

Benzylierung/Detritylierung A, d:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-Hydroxy-2-O-benzyl-octadecan

In 450 ml THF werden 0.1 mol 1-O-Trityl-2-hydroxy-octadecan und 0.12 mol Kalium-tert-butylat gelöst. Man erwärmt auf 50°C und tropft 0.12 mol Benzylchlorid in 150 ml THF zu. Nach zwei Stunden wird 0.045 mol Kalium-tert.-butylat zugesetzt und 0.045 mol Benzylchlorid in 60 ml zugetropft. Nach weiteren zwei Stunden werden 450 ml NaCl-Lsg. (100 g/l) zugegeben. Nach der Phasentrennung destilliert man das Lösungsmittel der org. Phase im Vakuum ab, nimmt den Rückstand in 1.6 l Dioxan/Methanol (1:1) auf und versetzt vorsichtig mit 15 ml konz. Schwefelsäure. Man rührt 1.5 Stunden bei 50°C, gibt dann zur Reaktionslösung 1.2 l Kaliumcarbonatlösung (40 g/l) sowie 150 ml konz. NaCl-Lsg.. Es wird mit 1.5 l Diisopropylether extrahiert. Die wässrige Phase wird nochmals mit 450 ml Diisopropylether extrahiert, die vereinigten org. Phasen im Vakuum abgedampft und der Rückstand in 70 ml Hexan aufgenommen. An 700 g Kieselgel wird erst mit 1.5 l Hexan, dann mit Hexan/Diisopropylether (20:1) säulenfiltriert, bis der Triethylether eluiert ist. Anschließend wird das Produkt mit Diethylether/Pentan 1:1 eluiert.

Ausbeute: 0.083 mol = 83 %

M = 376.622 g/mol ( $C_{25}H_{44}O_2$ )

$R_f$  = 0.35 (Diethylether/Pentan (1:1))

$R_f$  (Zwischenprodukt) = 0.80 (Diethylether/Pentan (1:1))

$R_f$  (Edukt) = 0.70 (Diethylether/Pentan (1:1))

- 17 -

Analyse: ber.: C = 79.73 H = 11.78 O = 8.49  
gef.: C = 79.81 H = 11.82 O = 8.27

Beispiel 5:Phosphorylierung A, e:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Phosphocholin-2-O-benzyl-octadecan

Zu 0.115 mol Phosphoroxychlorid wird unter Kühlung auf  $<10^{\circ}\text{C}$  0.1 mol 1-Hydroxy-2-O-benzyl-octadecan (A, d) zusammen mit 0.175 mol Triethylamin in 140 ml THF zugetropft. Man entfernt die Kühlung und läßt 10 Minuten rühren (KPG-Rührer). 0.133 mol N-Methylethanolamin zusammen mit 0.175 mol Triethylamin in 75 ml THF werden so zugetropft, daß die Reaktionstemperatur  $40^{\circ}\text{C}$  nicht übersteigt. Man saugt nach 15 Minuten vom Hydrochlorid ab und gießt das Filtrat unter Rühren zu 23 ml 6 N HCl. Nach 5 Minuten neutralisiert man mit konz. Ammoniaklösung. Das Lösungsmittel wird im Vakuum vorsichtig abgedampft, bis nur noch Wasser übergeht. Die Vorlage nimmt man mit 270 ml Chloroform und 340 ml Methanol auf und extrahiert gegen 230 ml Wasser. Das Lösungsmittel der unteren Phase wird, bis auf Reste an Wasser, vorsichtig im Vakuum abgedampft. Der Rückstand der Vorlage wird in 280 ml Dichlormethan/2-Propanol (1:3) aufgenommen und mit 0.24 mol Dimethylsulfat versetzt. Man erwärmt auf  $40^{\circ}\text{C}$  und tropft rasch 0.25 mol Kaliumcarbonat in 100 ml Wasser zu. Nach 30 Minuten intensiven Rührens läßt man abkühlen und trennt die Phasen. Das Lösungsmittel der oberen Phase wird im Vakuum abgedampft, der Rückstand in 500 ml Methanol und 450 ml Chloroform aufgenommen und gegen 450 ml Wasser extrahiert. Das Lösungsmittel der unteren Phase wird unter Zusatz von Toluol im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 55 ml Dichlormethan gelöst. Durch Zugabe von 600 ml Aceton wird das Rohprodukt über Nacht ausgefällt.

Dies, noch mit kleinen Mengen an Salzen, verunreinigte Produkt wird in der Folgereaktion eingesetzt.

$M = 541.750 \text{ g/mol } (C_{30}H_{56}O_5 \text{ NP})$

$R_f = 0.17$  (Chloroform/Methanol/Ammoniaklsg. 6 % (60:40:6))

Beispiel 6:

Debenzylierung A, f:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Phosphocholin-2-hydroxy-octadecan

Das noch mit anorganischen Salzen verunreinigte Rohprodukt der Phosphorylierung (A, e) (0.1 mol) wird in 450 ml Methanol/THF (1:1) aufgenommen. 10 g Pd/C (5 %ig) in 40 ml Wasser werden unter Rühren zugegeben. Nach Zugabe von 40 ml 1 N HCl leitet man 20 Minuten einen Stickstoffstrom durch die Reaktionslösung. Man schließt das Reaktionsgefäß an eine Hydrierapparatur an, die Hydrogenolyse erfolgt unter intensivem Rühren. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme (ca. 4 Stunden) wird vom Katalysator abgesaugt (Membran- oder Glasfaserfilter) und das Filtrat mit Ammoniaklösung neutralisiert. Man dampft die Lösungsmittel im Vakuum ab, nimmt den Rückstand mit 550 ml Methanol und 450 ml Chloroform auf und extrahiert zweimal mit je 450 ml 10 %iger Kochsalzlösung. Die Lösungsmittel der unteren Phase werden unter Zusatz von Toluol im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird unter Aufkochen in 160 ml Chloroform fein suspendiert. 1.6 l Aceton werden zugegeben und über 48 Stunden bei 4°C gefällt. Man erhält das reine Produkt durch Absaugen und Trocknung im Vakuum.

Ausbeute: 0.099 mol = 99 % (aus A, d = 90 %)

$M = 451.626 \text{ g/mol } (C_{23}H_{50}O_5 \text{ NP})$

$R_f = 0.12$  (Chloroform/Methanol/Ammoniaklsg. 6 % (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 61.17 H = 11.16 N = 3.10 P = 6.86

gef.: C = 61.15 H = 11.27 N = 3.15 P = 6.82

Beispiel 7Acylierung A, g:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Phosphocholin-2-O-acyl-octadecan

10 mmol des entsprechend konfigurierten 1-O-Phosphocholin-2-hydroxy-octadecan (A, f) und 21 mmol DMAP sowie 20 mmol des entsprechenden Säurechlorids bzw. des Acetanhydrids werden in 90 ml alkoholfreiem Chloroform im geschlossenen Kolben bei 30°C 16 Stunden im Ultraschallbad beschallt. 1 ml Methanol wird zugegeben, nach 10 Minuten wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. In  $X_1$  ml Chloroform wird aufgenommen und mit 560 ml bei  $X_2$  °C gefällt. Das Rohprodukt wird abgesaugt und mit 160 ml Chloroform und 180 ml Methanol aufgenommen. Man extrahiert gegen 135 ml Wasser, die obere Phase wird anschließend mit 200 ml Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert. Beim Produkt 1-O-Phosphocholin-2-O-acetyl-octadecan wird anstelle von 135 ml Wasser 10 %ige Kochsalzlösung verwendet. Die Lösungsmittel der vereinigten unteren Phasen werden nach Zusatz von Toluol unter Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird chromatographisch an 450 g Kieselgel gereinigt. Dabei eluiert man zuerst die rel. apolaren Verunreinigungen mit Chloroform/Methanol/Ammoniak (60:40:2) um anschließend das Produkt mit Chloroform/Methanol/Ammoniak (60:40:7) aus der Säule zu eluieren. Das Produkt 1-O-Phosphocholin-2-O-acetyl-octadecan wird mit Chloroform-Methanol-Ammoniak (55:45:9) eluiert. Die Produkte werden durch Zusatz von Toluol azeotrop getrocknet und im Vakuum anschließend von Wasser und Lösungsmittelresten befreit. Die Ausbeute beträgt  $X_3$  (mmol, %).

- 20 -

Säurechlorid/				
Nr.	anhydrid	X <sub>1</sub> [ml]	X <sub>2</sub> [°C]	
6	Acetanhydrid	20	-25 (12h)	
7	Laurinsäurechlorid	20	-20 (48h)	
8	Palmitinsäurechl.	80	4 (24h)	
9	Ölsäurechlorid	20	-20 (12h)	
10	Stearinsäurechl.	120	RT (24h)	

Nr.	X <sub>5</sub> [mmol, %]		Prod.	RF*	Schmelzpunkt [°C]
6	8.4,	84	(C-2-Ester)	0.93	130-150 (zers.)
7	7.0,	70	(C-12-Ester)	0.32	130-150 (zers.)
8	6.4,	64	(C-16-Ester)	0.24	135-150 (zers.)
9	6.9,	69	(C-18/1-Ester)	0.28	120-135 (zers.)
10	5.2,	52	(C-18-Ester)	0.30	130-150 (zers.)

+ = Laufmittel: Chloroform/Methanol/Ammoniak (6 %ig) 60:40:6

Molgewicht/			
Nr.	Summenformel	Analyse	
6	493.663	Ber.: C=60.82 H=10.61 N=2.83	
	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> O <sub>6</sub> NP	Gef.: C=59.86 H=10.06 N=2.71	
7	633.936	Ber.: C=66.31 H=11.44 N=2.20	
	C <sub>35</sub> H <sub>72</sub> O <sub>6</sub> NP	Gef.: C=65.32 H=11.58 N=2.16	
8	690.044	Ber.: C=67.88 H=11.68 N=2.02	
	C <sub>39</sub> H <sub>80</sub> O <sub>6</sub> NP	Gef.: C=67.56 H=11.78 N=2.02	



- 21 -

9	716.082	Ber.: C=68.77 H=11.54 N=1.95
	C <sub>41</sub> H <sub>82</sub> O <sub>6</sub> NP	Gef.: C=68.74 H=12.00 N=2.07
10	718.089	Ber.: C=68.57 H=11.79 N=1.95
	C <sub>41</sub> H <sub>84</sub> O <sub>6</sub> NP	Gef.: C=67.99 H=11.59 N=2.02

Beispiel 8Phtalimideinführung mit Konfigurationsumkehr/Detritylierung  
B, d:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-Hydroxy-2-N-Phtalimido-octadecan

Zu 0.1 mol 1-O-Trityl-2-hydroxy-octadecan in 600 ml THF werden 0.12 mol Phthalimid und 0.145 mol Triphenylphosphin gegeben. Unter Rühren und Kühlung auf 0°C wird langsam 0.146 mol Diethylazodicarboxylat in 120 ml THF zugetropft. Nach zwei Stunden wird zur Reaktionsmischung 1.2 l Kaliumcarbonatlsg. (40 g/l) und 120 ml konz. NaCl.-Lsg. gegeben und mit 1.2 l Diisopropylether extrahiert. Man extrahiert die obere Phase mit 230 ml konz. NaCl.-Lsg. und destilliert das Lösungsmittel im Vakuum ab. Der Rückstand wird in 50 ml Diisopropylether gelöst und auf eine Säule (650 g Kieselgel, Hexan/Diisopropylether 2:1 + 1 % Triethylamin) gegeben. Man eluiert zuerst die apolaren Verunreinigungen mit Hexan/Diisopropylether (2:1), dann das Zwischenprodukt mit Diisopropylether. Die produkthaltigen Phasen werden im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit 600 ml Methanol und 600 ml Dioxan aufgenommen und vorsichtig mit 12 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Man rührt 1.5 Stunden bei 60°C. Nach Abkühlung wird 1.2 l Kaliumcarbonatlsg. (40 g/l) zugegeben und gegen 1.2 l Diisopropylether extrahiert. Man trennt die Phasen, zieht das Lösungsmittel der oberen Phase ab und unterwirft den Rückstand einer Säulenfiltration an 700 g Kieselgel. Zuerst wird der Trityl-

- 22 -

ether mit Hexan/Diisopropylether, alsdann das Produkt mit Diethylether eluiert. Das Produkt wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.077 mol = 77 %

M = 415.618 g/mol ( $C_{26}H_{41}O_3N$ )

$R_f$  = 0.29 (Essigester/Hexan 1:2)

$R_f$  (Zwischenprodukt) = 0.67 (Essigester/Hexan 1:2)

$R_f$  (Edukt) = 0.69 (Essigester/Hexan 1:2)

Analyse: ber.: C = 73.21 H = 9.98 N = 4.10

gef.: C = 73.10 H = 10.25 N = 4.25

### Beispiel 9

#### Phosphorylierung B, e:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Phosphocholin-2-N-phthalimido-octadecan

Zu 0.115 mol Phosphoroxychlorid wird unter Kühlung auf  $<10^{\circ}\text{C}$  0.1 mol 1-Hydroxy-2-N-Phthalimido-octadecan zusammen mit 0.175 mol Triethylamin in 140 ml THF zugetropft. Man entfernt die Kühlung und läßt 10 Minuten rühren (KPG-Rührer). 0.133 mol N-Methylethanolamin zusammen mit 0.175 mol Triethylamin in 75 ml THF werden so zugetropft, daß die Reaktionstemperatur  $40^{\circ}\text{C}$  nicht übersteigt. Man saugt nach 15 Minuten vom Hydrochlorid ab und gießt das Filtrat unter Rühren zu 23 ml 6 N HCl. Nach 5 Minuten neutralisiert man mit konz. Ammoniaklösung. Das Lösungsmittel wird im Vakuum vorsichtig abgedampft, bis nur noch Wasser übergeht. Die Vorlage nimmt man mit 380 ml Chloroform und 460 ml Methanol auf und extrahiert gegen 310 ml Wasser. Das Lösungsmittel der unteren Phase wird, bis auf Reste an Wasser, vorsichtig im Vakuum abgedampft. Der Rückstand der Vorlage wird in 280 ml Dichlormethan/2-Propanol (1:3) aufgenommen und mit 0.24 mol Dimethylsulfat versetzt. Man erwärmt auf  $40^{\circ}\text{C}$  und tropft rasch 0.25 mol

- 23 -

Kaliumcarbonat in 100 ml Wasser zu. Nach 30 Minuten intensiven Rührens läßt man abkühlen und trennt die Phasen. Das Lösungsmittel der oberen Phase wird im Vakuum abgedampft, der Rückstand in 450 ml Methanol und 380 ml Chloroform aufgenommen und gegen 380 ml Wasser extrahiert. Das Lösungsmittel der unteren Phase wird unter Zusatz von Toluol im Vakuum abdestilliert, das resultierende Rohprodukt in der nächsten Reaktion eingesetzt.

M = 580.714 g/mol ( $C_{31}H_{53}O_6N_2P$ )

R<sub>f</sub> = 0.17 (Chloroform/Methanol/Ammoniaklsg. 6 : 4 : 6)

#### Beispiel 10

##### Phthalsäureabspaltung B, f:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Phosphocholin-2-amino-octadecan

Das noch mit Salzen verunreinigte Rohprodukt der Phosphorylierung, (B, e), (0.1 mol) wird in 310 ml 2-Propanol/Wasser/Toluol (6:1:1:5) gelöst. Nach Zugabe von 0.2 mol Natriumborhydrid bei 0°C läßt man über Nacht bei RT rühren. 0.05 mol Natriumborhydrid wird zugegeben, eine weitere Stunde intensiv gerührt. Durch vorsichtige Destillation im Vakuum wird das Lösungsmittel entfernt. Nach Umfüllen des Rückstandes mit insges. 380 ml Wasser in ein 4 l Becherglas wird unter ständigem Rühren und unter Eiskühlung insges. 380 ml konz. HCl sehr langsam und vorsichtig (schäumt!) zugegeben. Man rührt die Suspension 10 Stunden bei 80°C (Innentemperatur). Nach Abkühlung wird erst mit fester NaOH, anschließend mit 6 N NaOH auf pH 9.0 eingestellt. Es wird mit 2.4 l Methanol/Chloroform (1:1) extrahiert. Die obere Phase wird noch dreimal mit je 550 ml Chloroform extrahiert. Dabei befinden sich in der unteren Phase feste Bestandteile, die bei der weiteren Bearbeitung nicht stören. Die unteren Phasen werden vereinigt und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird unter

- 24 -

Erwärmung in 125 ml konz. HCl fein suspendiert, dann mit 550 ml Aceton versetzt und eine Stunde auf 0°C gekühlt. Nach Absaugen des feinen Niederschlags versetzt man das Filtrat mit weiteren 5 l Aceton und beläßt 24 Stunden bei -20°C. Es wird abgesaugt, der Rückstand in 370 ml 12 %ige Ammoniaklösung extrahiert. Mit je 250 ml Chloroform/Methanol (8:1) wird die obere Phase zweimal extrahiert. Das Produkt erhält man durch das Eindampfen der vereinigten unteren Phasen und Trocknung im Vakuum.

Ausbeute: 0.08 mol = 80 % (aus B, d = 70 %)

M = 450.641 g/mol ( $C_{23}H_{51}O_4N_2P$ )

$R_f$  = 0.05 (Chloroform/Methanol/Ammoniaklsg. 6 % (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 61.30 H = 11.55 N = 6.21

gef.: C = 60.55 H = 11.17 N = 5.76

### Beispiel 11

#### Acylierung B, g:

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Phosphocholin-2-N-acyl-octadecan

10 mmol des entsprechend konfigurierten Eduktes (B. f) und 21 mmol DMAP sowie 20 mmol des entsprechenden Säurechlorids bzw. des Acetanhydrids werden in 90 ml alkoholfreiem Chloroform im geschlossenen Kolben bei 30°C 10 Stunden im Ultraschallbad beschallt. 1 ml Methanol wird zugegeben, nach 10 Minuten wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. In  $X_1$  ml Chloroform wird aufgenommen und mit 560 ml bei  $X_2$  °C gefällt. Das Rohprodukt wird abgesaugt und mit 160 ml Chloroform und 180 ml Methanol aufgenommen. Man extrahiert gegen 135 ml Wasser, die obere Phase wird anschließend mit 200 ml Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert. Beim Produkt 1-O-Phosphocholin-2-N-acetyl-octadecan wird die obere Phase zusätzlich dreimal gegen je 110 ml Chloroform/Methanol (8:1) extrahiert. Die Lösungsmittel der vereinigten unteren Phasen werden unter

- 25 -

Zusatz von Toluol in Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird chromatographisch an 450 g Kieselgel gereinigt. Dabei eluiert man zuerst die rel. apolaren Verunreinigungen mit Chloroform/Methanol/Ammoniak (60:40:2), um anschließend das Produkt mit Chloroform/Methanol/ Ammoniak (60:40:7) aus der Säule zu eluieren. Das Produkt 1-O-Phosphocholin-2-N-acetyl-octadecan wird mit Chloroform/ Methanol/Ammoniak (50:50:9) eluiert. Die Produkte werden durch Zusatz von Toluol azeotrop getrocknet, im Hochvakuum werden sie anschließend von Wasser und Lösungsmittelresten befreit. Die Ausbeute beträgt  $X_3$  (mmol, %).

Säurechlorid/					
Nr.	anhydrid	$X_1$ [ml]	$X_2$ [°C]		
1	Acetanhydrid	9	-20 (12h)		
2	Laurinsäurechlorid	18	4 (12h)		
3	Palmitinsäurechl.	65	RT ( 2h)		
4	Ölsäurechlorid	22	4 (12h)		
5	Stearinsäurechl.	100	RT ( 3h)		

Nr.	$X_3$ [mmol, %]	Prod.	RF <sup>+</sup>	Schmelzpunkt [°C]
1	7.2, 72	(C-2-Amid)	0.12	200-210 (zers.)
2	6.7, 67	(C-12-Amid)	0.31	183-199 (zers.)
3	7.6, 76	(C-16-Amid)	0.25	201 (zers.)
4	7.6, 76	(C-18/1-Amid)	0.26	168 (zers.)
5	7.7, 77	(C-18-Amid)	0.19	193-202 (zers.)

+ = Laufmittel: Chloroform/Methanol/Ammoniak (6 %ig) 60:40:6

- 26 -

Nr.	Molgewicht/ Summenformel	Analyse
1	492.678 $C_{26}H_{53}O_5N_2P$	Ber.: C=60.95 H=10.84 N=5.69 Gef.: C=60.08 H=11.07 N=5.65
2	632.952 $C_{35}H_{73}O_5N_2P$	Ber.: C=66.41 H=11.62 N=4.42 Gef.: C=65.23 H=11.70 N=4.36
3	689.060 $C_{39}H_{81}O_5N_2P$	Ber.: C=67.98 H=11.84 N=4.06 Gef.: C=67.69 H=11.78 N=4.03
4	715.098 $C_{41}H_{83}O_5N_2P$	Ber.: C=68.86 H=11.69 N=3.91 Gef.: C=68.32 H=11.90 N=3.72
5	717.114 $C_{41}H_{85}O_5N_2P$	Ber.: C=68.67 H=11.94 N=3.90 Gef.: C=67.92 H=11.97 N=4.06

Beispiel 12:

Allylierung/Detritylierung (Stufe C, d)

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-Hydroxy-2-O-Allyl-octadecan

In 400 ml THF werden 0,1 mol 1-O-Trityl-2-hydroxy-octadecan und 0,12 mol Kalium-tert.-butylat gelöst. Man erwärmt auf 40°C und tropft 0,12 mol Allylchlorid in 140 ml THF zu. Nach 1,5 Stunden werden 0,02 mol Kalium-tert-butylat zugesetzt und weitere 0,02 mol Allylchlorid in 30 ml THF zugetropft. Nach weiteren 2 Stunden wird 400 ml Kochsalzlösung (100 g/l) zugegeben. Nach der Phasentrennung destilliert man das Lösungsmittel der org. Phase im Vakuum ab, nimmt den Rückstand in 1,3 l Dioxan/Methanol (1:1) auf und versetzt vorsichtig mit 15 ml konz. Schwefelsäure. Man rührt 1,5 Stunden bei 50°C und gibt dann 1 l Kaliumcarbonatlösung sowie 100 ml konz. Kochsalzlösung zu. Es wird mit 1 l Diisopropylether extrahiert.

- 27 -

Die wäßrige Phase wird nochmals mit 300 ml Diisopropylether extrahiert, die vereinigten org. Phasen im Vakuum abgedampft und der Rückstand in 70 ml Hexan aufgenommen. An 600 g Kieselgel wird erst mit 1 l Hexan, dann mit Hexan/Diisopropylether (20:1) säulenfiltriert, bis der Tritylether eluiert ist. Anschließend wird das Produkt mit Diethylether/Pentan eluiert.

Ausbeute: 0,081 mol = 81 %

M = 326,565 g/mol ( $C_{21}H_{42}O_2$ )

$R_f$  = 0,30 (Diethylether/Pentan (1:1))

$R_f$  (Zwischenprodukt) = 0,74 (Diethylether/Pentan (1:1))

$R_f$  (Edukt) = 0,70 (Diethylether/Pentan (1:1))

Analyse: ber.: C = 77,23 H = 12,96

gef.: C = 77,26 H = 13,00

### Beispiel 13

#### Benzylierung (Stufe C, e)

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Benzyl-2-O-allyl-octadecan

0,1 mol 1-Hydroxy-2-O-allyl-octadecan und 0,15 mol Kaliumtert.-butylat werden in 160 ml THF gelöst und auf 30°C erwärmt. Man tropft eine Lösung von 0,15 mol Benzylchlorid in 50 ml THF zu und läßt 5 Stunden bei 50°C rühren. Man extrahiert einmal mit 100 ml Wasser, dann zweimal mit je 50 ml Kochsalzlösung (150 g/l) und anschließend mit 30 ml 1 N HCl. Man nimmt in 100 ml Hexan auf und filtriert über 50 g Kieselgel. Die Lösungsmittel werden im Vakuum abdestilliert. Das Produkt wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,089 mol = 89 %

M = 466,75 g/mol ( $C_{32}H_{50}O_2$ )

$R_f$  = 0,77 (Hexan/Diisopropylether (2:1))

Analyse: ber.: C = 82,34 H = 10,79

gef.: C = 82,09 H = 10,67

Beispiel 14Allyletherspaltung (Stufe C, f)

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Benzyl-2-hydroxy-octadecan

0,1 mol 1-O-Benzyl-2-O-allyl-octadecan werden in 150 ml 2-Propanol aufgenommen und die Lösung mit 30 g Aktivkohle versetzt. Man rührt 20 Minuten, trennt die Aktivkohle ab und gibt 3 g Pd/C (5 %ig) sowie 10 ml 5 N HCl zu und läßt 48 Stunden unter Rückfluß kochen. Der Katalysator wird abgesaugt (Membran- oder Glasfaserfilter) und das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird aus 150 ml Hexan bei -20°C kristallisiert,, das feinkristalline Produkt im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,094 mol = 94 %

M = 376,622 g/mol (C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>)

R<sub>f</sub> = 0,50 (Diisopropylether)

Analyse: ber.: C = 79,73    H = 11,78    O = 7,49

gef.: C = 79,69    H = 11,74    O = 8,70

Beispiel 15Acylierung (Stufe C, g)

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Benzyl-2-O-lauroyl-octadecan

0,1 mol 1-O-Benzyl-2-O-hydroxy-octadecan, 1 g DMAP und 0,11 mol Laurinsäure werden in 200 ml Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. 0,12 mol DCC in 40 ml Dichlormethan werden zuge tropft. Man läßt 4 Stunden bei Raumtemperatur rühren und dann über Nacht bei 0°C stehen. Der Rückstand wird über einen Glasfaserfilter abgesaugt. Das Filtrat wird dann zweimal mit je 70 ml 1 N HCl und zweimal mit je 70 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Man trocknet über



Natriumsulfat und destilliert das Lösungsmittel im Vakuum ab. Zur Reinigung wird in 30 ml Hexan/Diisopropylether aufgeschlämmt und über 150 g Kieselgel filtriert.

Ausbeute: 0,080 mol = 80 %

M = 558,932 g/mol ( $C_{37}H_{66}O_3$ )

$R_f$  = 0,48 (Hexan/Diisopropylether (1:5))

Analyse: ber.: C = 79,51 H = 11,90 O = 8,58

gef.: C = 79,69 H = 11,75 O = 8,32

#### Beispiel 16

##### Debenzylierung (Stufe C, h)

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-Hydroxy-2-O-lauroyl-octadecan

0,1 mol 1-O-Benzyl-2-O-lauroyl-octadecan werden in 600 ml THF gelöst. 10 g Pd/C (5 %ig) in 20 ml Wasser werden zugegeben. Durch Zugabe von konz. Ameisensäure wird auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. Man hydriert etwa 2 Stunden unter starkem Rühren. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme wird von Katalysator abgesaugt (Membran- oder Glasfaserfilter) und die Lösungsmittelmengen durch Abdampfen im Vakuum bei Raumtemperatur etwa um die Hälfte verringert. Man versetzt mit 1,2 l Essigester und läßt 24 Stunden bei -20°C kristallisieren. Es wird abgesaugt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird sofort in die Folgereaktionen eingesetzt.

Ausbeute: 0,087 mol = 87 %

M = 468,807 g/mol ( $C_{30}H_{60}O_3$ )

$R_f$  = 0,46 (Diethylether/Pentan (1:1))

- 30 -

Beispiel 17Benzilylierung (Stufe D, e)

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Benzyl-2-N-phthalimido-octadecan

0,1 mol 1-Hydroxy-2-N-phthalimido-octadecan und 0,15 mol Kalium-tert.-butylat werden in 200 ml THF gelöst und auf 50°C erwärmt. 0,15 mol Benzylchlorid in 80 ml THF werden innerhalb von 10 Minuten zugetropft, anschließend läßt man noch 3 Stunden bei 50°C rühren. Man extrahiert einmal gegen 100 ml Wasser und zweimal gegen je 50 ml Kochsalzlösung (150 g/l). Man destilliert das org. Lösungsmittel im Vakuum ab und reinigt das Rohprodukt durch Umkristallisation aus 150 ml Methanol und anschließend aus 150 ml 2-Propanol.

Ausbeute: 0,090 mol = 90 %

M = 505,743 g/mol ( $C_{33}H_{47}O_3N$ )

$R_f$  = 0,70 (Essigester/Hexan (1:2))

Analyse: ber.: C = 78,37 H = 9,36 O = 9,49

gef.: C = 78,34 H = 9,47 O = 9,39

Beispiel 18Phthalsäureabspaltung (Stufe D, f)

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Benzyl-2-amino-octadecan

0,1 mol 1-Benzyl-2-N-phthalimido-octadecan werden in 1,1 l 2-Propanol/Wasser (6:1) gelöst. 0,5 mol Natriumborhydrid werden unter Kühlung vorsichtig zugesetzt. Man entfernt die Kühlung und läßt 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Von etwa der Hälfte des Lösungsmittels wird im Vakuum vorsichtig abdestilliert. 500 ml Essigsäure werden sehr langsam und vorsichtig (Schaumbildung) zugegeben, anschließend erhitzt man 4 Stunden auf 80°C. Von der Essigsäure wird im Vakuum abgedampft und

der Rückstand mit 1 N NaOH-Lösung auf einen pH von 8,5 eingestellt. Man extrahiert die wässrige Phase zweimal mit je 1 l Diethylether. Nach dem Abdestillieren der organischen Phase reinigt man das Produkt chromatographisch an 800 g Kieselgel. Dabei werden zuerst die apolaren Verunreinigungen mit Chloroform/Methanol (20:1) eluiert. Anschließend wird das Produkt mit Chloroform/Methanol (1:1) eluiert.

Ausbeute: 0,088 mol = 88 %

M = 375,641 g/mol ( $C_{25}H_{45}ON$ )

$R_f$  = 0,21 (Chloroform/Methanol (9:1))

Analyse: ber.: C = 79,93 H = 12,07

gef.: C = 79,90 H = 11,89

#### Beispiel 19

##### Acylierung (Stufe D, g)

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-O-Benzyl-2-N-lauroyl-octadecan

0,1 mol 1-O-Benzyl-2-amino-octadecan, 1 g DMAP und 0,11 mol Laurinsäure werden in 200 ml Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. 0,12 mol DCC in 40 ml Dichlormethan werden zuge- tropft. Man läßt 4 Stunden bei Raumtemperatur rühren und dann über Nacht bei 0°C stehen. Der Rückstand wird über einen Glasfaserfilter abgesaugt. Das Filtrat wird dann zweimal mit je 70 ml 1 N HCl und zweimal mit je 70 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Man trocknet über Natriumsulfat und destilliert das Lösungsmittel im Vakuum ab. Zur Reinigung wird in 30 ml Hexan/Diisopropylether aufgeschlämmt und über 150 g Kieselgel filitriert.

- 32 -

Ausbeute: 0,096 mol = 96 %

M = 557,948 g/mol ( $C_{37}H_{67}O_2N$ )

$R_f$  = 0,35 (Hexan/Diisopropylether (1:5))

$R_f$  (Edukt) = 0,04 (Hexan/Diisopropylether (1:5))

Analyse: ber.: C = 79,65 H = 12,10

gef.: C = 79,30 H = 11,93

### Beispiel 20

#### Debenzylierung (Stufe D, h)

Bsp.: 2-(R/S/rac)-1-Hydroxy-2-N-lauroyl-octadecan

0,1 mol 1-O-Benzyl-2-N-lauroyl-octadecan werden in 600 ml THF gelöst. 10 g Pd/C (5 %ig) in 20 ml Wasser werden zugegeben. Man hydriert etwa 2 Stunden unter starkem Rühren. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme wird von Katalysator abgesaugt (Membran- oder Glasfaserfilter) und die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand, das Produkt, wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,098 mol = 98 %

M = 467,823 g/mol ( $C_{30}H_{61}O_2N$ )

$R_f$  = 0,28 (Diethylether/Pentan (1:1))

Analyse: ber.: C = 77,02 H = 13,14

gef.: C = 76,88 H = 13,06

Phosphorylierungsreaktionen nach Schema C, iBeispiel 21Phosphorylierungen (Stufe C, i)

PE<sub>1</sub> - Bsp.: 2-(R)-1-O-Phosphoethanolamin-2-O-lauroyl-eicosan

Ausbeute: 0,090 mol = 90 %

M = 619,90 g/mol (C<sub>34</sub>H<sub>70</sub>O<sub>6</sub>NP)

R<sub>f</sub> = 0,5 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6)

Analyse: ber.: C = 65,88 H = 11,38 N = 2,26

gef.: C = 65,61 H = 11,37 N = 2,34

Eibl, H. und Engel, J.: Synthesis of hexadecylphosphocholine (Miltefosine). In: Alkylphosphocholines: New Drugs in Cancer Therapy. Eds. H. Eibl, P. Hilgard und C. Unger, Karger, Basel (1992), 1-5

Die Phosphorylierung wurde nach obiger Vorschrift ausgehend von 2-(R)-Hydroxy-2-O-lauroyl-eicosan durchgeführt.

Beispiel 22

PE<sub>2</sub> - Bsp.: 2-(S)-1-O-(N-Methyl)-phosphoethanolamin-2-O-lauroyl-eicosan

Ausbeute: 0,087 mol = 87 %

M = 633,93 g/mol (C<sub>35</sub>H<sub>72</sub>O<sub>6</sub>NP)

R<sub>f</sub> = 0,45 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6)

Analyse: ber.: C = 66,31 H = 11,45 N = 2,21

gef.: C = 56,89 H = 11,43 N = 2,28

Die Phosphorylierung wurde nach Eibl und Engel, siehe oben, ausgehend von 2-(S)-Hydroxy-2-O-lauroyl-eicosan durchgeführt.

Beispiel 23

PI - Bsp.: 2-(S)-1-O-Phospho-(L-myo-inositol)-2-O-lauroyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,002 mol = 40 %

M = 760,96 g/mol ( $C_{38}H_{74}O_{11}PNa$ )

$R_f$  = 0,26 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 59,98 H = 9,80 P = 4,07

gef.: C = 59,71 H = 9,80 P = 4,05

Die Phosphorylierung wurde nach Filthuth und Eibl (Filthuth, E. und Eibl, H.: Synthesis of enantiomerically pure lysophosphatidylinositols and alkylphosphoinositols. Chem. Phys. Lipids 60 (1991/1992) 253-261) durchgeführt.

Beispiel 24

PG - Bsp.: 2-(R)-1-O-Phosphoglycerin-2-O-lauroyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,080 mol = 80 %

M = 672,90 g/mol ( $C_{35}H_{70}O_8PNa$ )

$R_f$  = 0,65 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 62,47 H = 10,48 P = 4,60

gef.: C = 62,19 H = 10,48 P = 4,58

Die Synthese wurde nach Woolley und Eibl (Woolley, P. und Eibl, H.: Synthesis of enantiomerically pure phospholipids including phosphatidylserine and phosphatidylglycerol. Chem. Phys. Lipids 47 (1988) 52-62) durchgeführt.

Beispiel 25

P - Bsp.: 2-(S)-1-O-Phospho-2-O-lauroyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,081 mol = 81 %

M = 598,82 g/mol ( $C_{32}H_{64}O_6PNa$ )

$R_f$  = 0,01 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 64,19 H = 10,77 P = 5,17

gef.: C = 63,78 H = 10,76 P = 5,14

Die Phosphorylierung wurde nach Eibl und Blume (Eibl, H. und Blume, A.: The influence of charge on phosphatidic acid bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta 553 (1979) 476-488) durchgeführt.

Beispiel 26

a)  $POCH_3$

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phosphomethyl-2-O-lauroyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,084 mol = 84 %

M = 612,84 g/mol ( $C_{33}H_{66}O_6PNa$ )

$R_f$  = 0,95 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 64,68 H = 10,85 P = 5,05

gef.: C = 64,36 H = 10,84 P = 5,03

b)  $POCH_2CH_3$

Bsp.: 2-(S)-1-O-Phosphoethyl-2-O-lauroyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,075 mol = 75 %

M = 626,87 g/mol ( $C_{34}H_{68}O_6PNa$ )

$R_f$  = 0,90 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 65,14 H = 10,93 P = 4,94

gef.: C = 64,89 H = 10,92 P = 4,92

Die Methyl- und Ethylphosphorsäureester der obigen Verbindungen wurden nach Träuble et al. (Träuble H. et al.: Electrostatic interactions at charged lipid membranes. I. Effects of pH and univalent cations on membrane structure. Biophys. Chem. 4 (1976) 319-342) erhalten.

### Beispiel 27

a)  $\text{POCH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

Bsp.: 2-(S)-1-O-Phosphoglycol-2-O-lauroyl-eicosan, Natrium-salz

Ausbeute: 0,090 mol = 90 %

M = 642,87 g/mol ( $\text{C}_{34}\text{H}_{68}\text{O}_7\text{PNa}$ )

$R_f$  = 0,55 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 63,52 H = 10,66 P = 4,82

gef.: C = 63,24 H = 10,65 P = 4,80

b)  $\text{POCH}_2\text{-}\overset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{-CH}_3$

Bsp.: 2-(S)-1-O-Phosphopropandiol-(1,2)-2-O-lauroyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,065 mol = 65 %

M = 656,90 g/mol ( $\text{C}_{35}\text{H}_{70}\text{O}_7\text{PNa}$ )

$R_f$  = 0,60 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 64,00 H = 10,74 P = 4,72

gef.: C = 63,44 H = 10,73 P = 4,67

c)  $\text{POCH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phosphopropandiol-(1,3)-2-O-lauroyl-eicosan

Ausbeute: 0,060 mol = 60 %

M = 656,90 g/mol ( $\text{C}_{35}\text{H}_{70}\text{O}_7\text{PNa}$ )

$R_f$  = 0,55 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))



- 37 -

Analyse: ber.: C = 64,00 H = 10,74 P = 4,72  
gef.: C = 63,82 H = 10,61 P = 4,65

Die Phosphorsäureglykolester, Phosphorsäurepropandiol-(1,2)-ester und die Phosphorsäurepropandiol-(1,3)-ester obiger Verbindungen wurden nach Woolley und Eibl (supra) erhalten unter Verwendung der entsprechenden Benzylether.

### Phosphorylierungsreaktionen nach Schema D, i

#### Beispiel 28

##### D, i - Phosphorylierungen

PE<sub>1</sub> (analog C, i) -

Bsp.: 2-(S)-1-O-Phosphoethanolamin-2-N-lauroyl-eicosan

Ausbeute: 0,085 mol = 85 %

M = 618,92 g/mol (C<sub>34</sub>H<sub>71</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>P)

R<sub>f</sub> = 0,5 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6)

Analyse: ber.: C = 65,98 H = 11,56 N = 4,53

gef.: C = 65,60 H = 11,55 N = 4,59

#### Beispiel 29

PE<sub>2</sub> (analog C, i) -

Bsp.: 2-(S)-1-O-(N-Methyl)-phosphoethanolamin-2-N-lauroyl-eicosan

Ausbeute: 0,082 mol = 82 %

M = 632,95 g/mol (C<sub>35</sub>H<sub>73</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>P)

R<sub>f</sub> = 0,45 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6)

Analyse: ber.: C = 66,42 H = 11,62 N = 4,43

gef.: C = 65,80 H = 11,60 N = 4,54

Beispiel 30

PI (analog C, i) -

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phospho-(L-myo-inositol)-2-N-lauroyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,02 mol = 30 %

M = 760,96 g/mol ( $C_{38}H_{75}O_{10}NPNa$ ) $R_f$  = 0,25 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 60,06 H = 9,95 P = 4,08

gef.: C = 59,69 H = 9,93 P = 4,05

Beispiel 31

PG (analog C, i) -

Bsp.: 2-(S)-1-O-Phosphoglycerin-2-N-lauroyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,075 mol = 75 %

M = 671,91 g/mol ( $C_{35}H_{71}O_7NPNa$ ) $R_f$  = 0,65 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 62,57 H = 10,65 P = 4,61

gef.: C = 62,00 H = 10,63 P = 4,57

Beispiel 32

P (analog C, i) -

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phospho-2-N-lauroyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,076 mol = 76 %

M = 597,83 g/mol ( $C_{32}H_{65}O_5NPNa$ ) $R_f$  = 0,01 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 64,29 H = 10,96 P = 5,18

gef.: C = 63,97 H = 10,95 P = 5,15

Beispiel 33POCH<sub>3</sub> (analog C, i) -

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phosphomethyl-2-N-lauroyl-eicosan, Natrium-salz

Ausbeute: 0,080 mol = 80 %

M = 611,86 g/mol (C<sub>33</sub>H<sub>67</sub>O<sub>5</sub>NPNa)R<sub>f</sub> = 0,85 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6)

Analyse: ber.: C = 64,78 H = 11,04 P = 5,06

gef.: C = 64,50 H = 11,03 P = 5,04

Beispiel 34POCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (analog C, i) -

Bsp.: 2-(S)-1-O-Phosphoethyl-2-N-lauroyl-eicosan, Natrium-salz

Ausbeute: 0,069 mol = 69 %

M = 625,89 g/mol (C<sub>34</sub>H<sub>69</sub>O<sub>5</sub>NPNa)R<sub>f</sub> = 0,90 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6)

Analyse: ber.: C = 65,25 H = 11,11 P = 4,95

gef.: C = 64,88 H = 11,09 P = 4,92

Beispiel 35POCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH (analog C, i) -

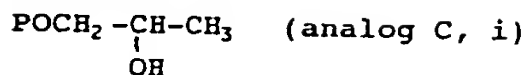
Bsp.: 2-(R)-1-O-Phosphoglycol-2-N-lauroyl-eicosan, Natrium-salz

Ausbeute: 0,078 mol = 78 %

M = 641,89 g/mol (C<sub>34</sub>H<sub>69</sub>O<sub>6</sub>NPNa)R<sub>f</sub> = 0,55 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6)

Analyse: ber.: C = 63,62 H = 10,83 P = 4,83

gef.: C = 63,43 H = 10,83 P = 4,81

Beispiel 36

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phosphopropandiol-(1,2)-2-N-lauroyl-eicosan,  
Natriumsalz

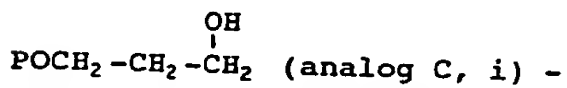
Ausbeute: 0,058 mol = 58 %

M = 655,91 g/mol ( $\text{C}_{35}\text{H}_{71}\text{O}_6\text{NPNa}$ )

$R_f$  = 0,60 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 64,09 H = 10,91 P = 4,72

gef.: C = 63,76 H = 10,90 P = 4,70

Beispiel 37

Bsp.: 2-(S)-1-O-Phosphopropandiol-(1,3)-2-N-lauroyl-eicosan

Ausbeute: 0,065 mol = 65 %

M = 655,91 g/mol ( $\text{C}_{35}\text{H}_{70}\text{O}_7\text{PNa}$ )

$R_f$  = 0,55 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 64,09 H = 10,91 P = 4,72

gef.: C = 63,81 H = 10,84 P = 4,68

- 41 -

Beispiele 38

PS (analog Beispiel 24)

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phospho-L-serin-2-N-acetyl-eicosan, Natrium-salz

Ausbeute: 0,061 mol = 61 %

M = 516,59 g/mol ( $C_{23}H_{46}NaNO_7P$ ) $R_f$  = 0,20 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 53,48 H = 8,98 P = 6,00

gef.: C = 53,21 H = 8,83 P = 5,89

Beispiel 39

PS (analog Beispiel 24)

Bsp.: 2-(S)-1-O-Phospho-L-serin-2-N-acetyl-eicosan, Natrium-salz

Ausbeute: 0,053 mol = 53 %

M = 516,59 g/mol ( $C_{23}H_{46}NaN_2O_7P$ ) $R_f$  = 0,20 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: wie R-Form

gef.: C = 53,14 H = 8,91 P = 5,89

Beispiel 40

P-(N,N,N-trimethyl)-S- (analog Beispiel 21)

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phospho-(N,N,N-trimethyl)-L-serin-2-N-acetyl-eicosan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,041 mol = 41 %

M = 558,67 g/mol ( $C_{26}H_{52}NaN_2O_7P$ ) $R_f$  = 0,10 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 55,63 H = 9,38 N = 5,01 P = 5,54

gef.: C = 55,63 H = 9,22 N = 4,89 P = 5,44

Beispiel 41

PS - (analog Beispiel 24)

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phospho-L-serin-2-O-ethyl-nonadecan, Natrium-salz

Ausbeute: 0,055 mol = 55 %

M = 517,62 g/mol ( $C_{24}H_{49}NaNO_7P$ ) $R_f$  = 0,20 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 55,69 H = 9,54 N = 2,70 P = 5,98

gef.: C = 55,45 H = 9,47 N = 2,63 P = 5,87

Beispiel 42

P-(N,N-dimethyl)-S- (analog Beispiel 24)

Bsp.: 2-(S)-1-O-Phospho-(N,N-dimethyl)-D-serin-2-O-ethyl-heptadecan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,047 mol = 47 %

M = 517,62 g/mol ( $C_{24}H_{49}NaNO_7P$ ) $R_f$  = 0,15 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 55,69 H = 9,54 N = 2,70 P = 5,98

gef.: C = 55,51 H = 9,43 N = 2,59 P = 5,83

Beispiel 43

PN - (analog Beispiel 24)

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phospho-sn-1'-glycerin-2-amino-octadecan, Natriumsalz

Ausbeute: 0,061 mol = 61 %

M = 461,56 g/mol ( $C_{21}H_{45}NaNO_6P$ ) $R_f$  = 0,20 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6))

Analyse: ber.: C = 54,64 H = 9,82 N = 3,03 P = 6,71

gef.: C = 54,43 H = 9,67 N = 2,78 P = 6,50

Beispiel 44

PN - (analog Beispiel 24)

Bsp.: 2-(R)-1-O-Phospho-sn-1'-glycerin-2-(N,N,N-trimethyl)-  
ammonium-eicosan

Ausbeute: 0,045 mol = 45 %

M = 509,70 g/mol ( $C_{26}H_{56}NO_6P$ ) $R_f$  = 0,15 (Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (60:40:6)

Analyse: ber.: C = 61,27 H = 11,07 N = 2,75 P = 6,08

gef.: C = 61,05 H = 11,00 N = 2,73 P = 6,07

Beispiel 45Bestimmung der Enantiomerenreinheit der erfindungsgemäßen  
Substanzen

Hierzu wurden die "Mosher"-ester (Ester der (R)-(+)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluormethylphenyllessigsäure) von A oder B, c sowie von A, d und von B, d synthetisiert. Die Ester wurden 19F-NMR-spektroskopisch daraufhin überprüft, ob sich durch Veresterung mit dem chiralen Alkohol nur ein diastereomerer Ester gebildet hat, wie es von einem enantiomeren reinen Alkohol erwartet wird. Zum Vergleich wurden die 19F-NMR-Spektren der "Mosher"-ester der racemischen Alkohole herangezogen. Die hier überprüften Alkohole werden im Verlauf der Synthese in die erfindungsgemäßen Substanzen überführt, ohne daß die O-C oder N-C-Bindung im chiralen Zentrum in einer Folgereaktion beeinflusst wird. Die optische Reinheit der hier untersuchten Alkohole ist also voll auf die erfindungsgemäßen Substanzen zu übertragen.

Beispiel 46Synthese der "Mosher"-ester:

X1 mg (0.250 mmol) des zu veresternden Alkohols wird zusammen mit 79.6 mg (0.386 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 82.0 mg (0.350 mmol) (R)-(+)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluormethyl-phenylelessigsäure (R-Moshersäure) sowie einem Kristall DMAP in 1.5 ml alkoholfreiem Chloroform gelöst und drei Stunden bei RT gerührt. (Prüfung des vollständigen Umsatzes durch DC-Kontrolle) Vom Lösungsmittel wird vorsichtig im Vakuum abdestilliert. Man reinigt das Produkt säulenchromatographisch an 25 g Kieselgel. Die "Mosher"-ester der Alkohole 1-Hydroxy-2-O-benzyl-octadecan und 1-Hydroxy-2-N-phthal-imido-octadecan werden mit Essigester/Hexan (1:4) eluiert, die "Mosher"-ester der Alkohole 1-O-Trityl-2-hydroxy-octadecan werden mit Diisopropylether/Hexan (1:7) eluiert. Ausbeute: X2 mg (X3 mmol) = X4 %

Nr.	Alkohol	X <sub>1</sub> [mg]	X <sub>2</sub> [mg]X <sub>3</sub>	[mmol]	X <sub>4</sub> [%]
1	1-Hydroxy-2-O-benzyl-octadecan (A, d)	94	147	0.247	99
2	1-Hydroxy-2-N-phthalimido-octadecan (B, d)	105	117	0.185	74
3	1-O-Trityl-2-hydroxy-octadecan (A oder B, d)	132	134	0.195	78



- 45 -

"Mosher"-ester			
Nr.	R <sub>F</sub>	(Laufmittel)	Molgewicht/Summenformel
1	0.62	(Essigester/ Hexan 1:4)	592.783 (C <sub>35</sub> H <sub>51</sub> O <sub>4</sub> F <sub>3</sub> )
2	0.41	(Essigester/ Hexan 1:4)	631.776 (C <sub>36</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub> NF <sub>3</sub> )
3	0.43	(Diisopropyl- ether/ Hexan 1:7)	687.985 (C <sub>47</sub> H <sub>59</sub> O <sub>4</sub> F <sub>3</sub> )

Die zu Vergleichszwecken dienenden "Mosher"-ester entsprechenden racemischen Alkohole wurden durch Mischung der "Mosher"-ester der chiralen Alkohole erzeugt.

<sup>19</sup>F-NMR (CDCl<sub>3</sub>):

"Mosher"-ester von	Chemische Verschiebung	
rac-(A oder B, c)	δ=-71.83	δ=-72.26
R-(A oder B, c)	δ=-71.82	
S-(A oder B, c)		δ=-72.26
-----		
rac-(B, d)	δ=-72.11	δ=-72.58
R-(B, d)	δ=-72.11	
S-(B, d)		δ=-72.58
-----		
rac-(A, d)	δ=-72.06	δ=-72.12
R-(A, d)	δ=-72.06	
S-(A, d)		δ=-72.12

Aus den Spektren ist ersichtlich, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen enantiomerenrein sind. Die Signalintensitäten des jeweilig unerwünschten Distereomers liegen unter 1 %. Das unerwünschte Diastereomerensignal kann auch von der nicht vollständigen Enantiomerenreinheit der handelsüblichen R-"Mosher"-säure herrühren. (ee>99%) Der Enantiomerenüberschuß

der chiralen erfindungsgemäßen Substanzen beträgt folglich mehr als 99 %.

#### Beispiel 47

##### Bestimmung der Substrateigenschaften gegenüber Phospholipase A2 (PLA2)

Das Volumen eines Testansatzes betrug 2 ml. Pro Testansatz wurden in einem Reagenzglas 2  $\mu\text{mol}$  Substrat (Substrat in Lösung/Suspension; 20  $\mu\text{mol/ml}$  Wasser) in der entsprechenden Menge Puffer (Tris/HCl 100 mM + 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH: 8.9) aufgenommen und im Ultraschallbad bei 45°C 30 Minuten suspendiert.

Die Proben wurden im Wasserbad bei 25°C vorinkubiert, dann die Reaktion durch Zugabe der PLA<sub>2</sub>-Lösung gestartet. Dabei wurde je nach Substrateigenschaften 0.01-1 U Enzym zugegeben. Die Inkubationszeiten variierten von 10-60 Minuten. Für jedes Substrat wurden Kontrollansätze ohne Enzym parallel durchgeführt. Die Enzymmenge und die Inkubationszeiten wurden so gewählt, daß maximal 10 % des eingesetzten Substrates umgesetzt wurden. Mindestens drei Bestimmungen wurden für jedes Substrat durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Extraktion mit je 2 ml Chloroform/Methanol (3:1) gestoppt. Es wurde 5 Minuten zentrifugiert (500 g), die untere Phase separiert. Die obere Phase wurde daraufhin noch einmal mit 2 ml Chloroform/Methanol (3:1), dann mit 2 ml Chloroform extrahiert und zentrifugiert. Die vereinigten unteren Phasen wurden im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit.

Der Rückstand wurde in 200-2000  $\mu\text{l}$  Chloroform/Methanol/Wasser 30:60:8 aufgenommen. Aus diesen Lösungen wurden Aliquots von 2-20  $\mu\text{l}$  entnommen und zur quantitativen Bestimmung der Produktmenge durch die HPTLC-Technik eingesetzt.

Aus den Mengen des gebildeten Produktes, den eingesetzten Enzymmengen und den Inkubationszeiten wurden die spezifischen Aktivitäten der PLA<sub>2</sub> gegen die entsprechenden Substrate in  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg} = \text{U}/\text{mg}$  berechnet. Mit den reinen Produkten wurde in einem analogen Ansatz die Ausbeute an extrahiertem Produkt bestimmt und damit das experimentelle Ergebnis korrigiert. Die Eichlösungen wurden durch Einwage der Produkte und Aufnahme in Chloroform/Methanol/Wasser 30:60:8 hergestellt. Die Konzentration der Eichlösungen betrug 100 pmol/ $\mu\text{l}$ .

Zur Durchführung der Messung der Inhibitorwirkung auf die PLA<sub>2</sub>-Hydrolyse von DPPC bzw. PAF wurde die entsprechende Menge "Inhibitor" mit DPPC bzw. PAF gemeinsam beschallt und die Probe dann der PLA<sub>2</sub>-Hydrolyse unterworfen. Man bestimmt wie beschrieben die entstandene Menge Lysolipid und berechnet im Vergleich mit einer, nicht mit "Inhibitor" behandelten, DPPC- bzw. PAF-Probe die Inhibitionswirkung. Bei "Inhibitoren", die auch der PLA<sub>2</sub>-Hydrolyse unterliegen, wird die Hemmung auf das DPPC/PLA<sub>2</sub> bzw. PAF/PLA<sub>2</sub>-System bestimmt, indem die Verhältnisse der unabhängig voneinander gemessenen Umsatzraten mit den Verhältnissen der gemeinsam gemessenen Umsatzraten verglichen werden.

#### Beispiel 48

##### Durchführung von HPTLC-Analysen

Vor dem Auftragen der Eich- und Meßlösungen auf die HPTLC-Platte ließ man die Platte in Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) 50:50:4 vorlaufen, um Verschmutzungen zu entfernen. Die Platte wurde 10 Minuten bei 180°C getrocknet. 2-10  $\mu\text{l}$  der Eichlösungen sowie 2-20  $\mu\text{l}$  der zu messenden Produktlösungen wurden mit einem HPTLC-Auftragegerät auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Man entwickelte die Platte im für die Substrat/Produkt-Trennung günstigsten Laufmittel (Tab. X.1). Die entwickelten Platten trockneten 10 Minuten bei 180°C. Zum

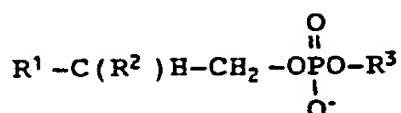
Anfärben wurde die erkaltete Platte 15 Sekunden in eine Lösung von 100 g Kupfersulfat in 906 ml Wasser und 94 ml Phosphorsäure (85 %) getaucht. Man ließ die Platte ein Minute bei 110°C trocknen. Die Anfärbung erfolgte schließlich durch Erhitzen der Platte auf 180°C. Je nach Produkt dauerte dieser Vorgang 1-4 Minuten. Die so angefärbte Platte wurde in einem Densitometer vermessen. Über die mitaufgetragenen Eichsubstanzen und der daraus resultierenden Eichkurve wurden die Produktmengen bestimmt. Diese konnten dann zur Berechnung der enzymatischen Umsätze herangezogen werden.

Substrat	Laufmittel (RF-Werte: Substrat/Produkt)
DPPC	A (0.44/0.34)
PAF	B (0.18/0.10)
(C-2-Ester)	B (0.15/0.09)
(C-12-Ester)	A (0.39/0.22)
(C-16-Ester)	A (0.39/0.22)
(C-18/1-Ester)	A (0.38/0.22)
(C-18-Ester)	A (0.35/0.22)
(C-2-Amid)	B (0.12/0.07)
(C-12-Amid)	A (0.33/0.16)
(C-16-Amid)	A (0.34/0.16)
(C-18/1-Amid)	A (0.33/0.16)
(C-18-Amid)	A (0.33/0.16)

Laufmittel A: Chloroform/Methanol/Triethylamin/Wasser  
60:70:68:16 Laufmittel B: Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %)

## Patentansprüche

1. Enantiomerenreine Phosphorsäureester und Phosphorsäurediester in beiden möglichen Konfigurationen und auch die Racemate der allgemeinen Formel



wobei  $R^1$  ein  $C_{10}$ - $C_{22}$ -Alkylrest bedeutet,  
 $R^2$  ein  $O-CO-R^4$ ,  $NH-CO-R^4$ ,  $-OH$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OC_2H_5$ ,  $-OC_3H_7$ ,  
 $-NH_2$ ,  $-NHCH_3$ ,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-N^+(CH_3)_3Cl^-$  bedeutet,  
 $R^4$  ein  $C_1$ - $C_{20}$ -Alkylrest ist und  
 $R^3$  für einen der folgenden Reste steht:  $-C_2H_4-N^+(CH_3)_3$ ,  
 $-C_2H_4-N^+H(CH_3)_2$ ,  $-C_2H_4-N^+H_2CH_3$ ,  $-C_2H_4-N^+H_3$ , Pentahydroxycyclohexanyl-, insbesondere myo-Inositolderivate, 1,2- oder 2,3- (R oder S)-Dihydroxypropanyl-, Seryl (D oder L)-, (N-Methyl)-Seryl (D oder L)-, (N,N-Dimethyl)-Seryl (D oder L)-, (N,N,N-Trimethyl)-Seryl (D oder L)-, H-, Methyl-, Ethyl-, Hydroxyethyl-, 3-Hydroxypropyl-, 2-Hydroxypropyl, wobei

$R^2$  und  $O - \overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}} - OR^3$  auch miteinander vertauschbar sind, sowie

deren Enantiomeren.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^1$  ein  $C_{14}$ - $C_{18}$ -Alkylrest ist.

3. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^2$  ein Palmitoylrest ist.
4. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^2$  ein Hydroxylrest ist und das ihn tragende C-Atom die S-Konfiguration aufweist.
5. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^2$  ein Hydroxylrest ist und das ihn tragende C-Atom die R-Konfiguration aufweist.
6. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^3$  eine Aminogruppe ist und das ihn tragende C-Atom die S-Konfiguration aufweist.
7. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^3$  eine Aminogruppe ist und das ihn tragende C-Atom die R-Konfiguration aufweist.
8. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1, 2, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^2$  ein  $C_2-C_5$ -Carbonsäureamid ist und daß das diesen Rest tragende C-Atom die R-Konfiguration aufweist.
9. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1, 2, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^2$  ein  $C_2-C_5$ -Carbonsäureamid ist und daß das diesen Rest tragende C-Atom die S-Konfiguration aufweist.

10. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1, 2, 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß  $R^2$  ein  $C_2$ - $C_5$ -Carbonsäureester ist und daß das diesen  
Rest tragende C-Atom die R-Konfiguration aufweist.
11. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1, 2, 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß  $R^2$  ein  $C_2$ - $C_5$ -Carbonsäureester ist und daß das diesen  
Rest tragende C-Atom die S-Konfiguration aufweist.
12. Verbindungen nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß  $R^2$  ein Essigsäureamid ist und daß das diesen Rest  
tragende C-Atom die R-Konfiguration aufweist.
13. Verbindungen nach Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß  $R^2$  ein Essigsäureamid ist und daß das diesen Rest  
tragende C-Atom die S-Konfiguration aufweist.
14. Verbindungen nach Anspruch 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß  $R^2$  ein Essigsäureester ist und daß das diesen Rest  
tragende C-Atom die R-Konfiguration aufweist.
15. Verbindungen nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß  $R^2$  ein Essigsäureester ist und daß das diesen Rest  
tragende C-Atom die S-Konfiguration aufweist.
16. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1, 2, 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß  $R^2$  ein Fettsäureamidrest mit 10 bis 17 C-Atomen  
ist.

17. Verbindungen nach Anspruch 16,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß das den Fettsäureamidrest aufweisende C-Atom die R-  
Konfiguration aufweist.
18. Verbindungen nach Anspruch 16,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß das den Fettsäureamidrest tragende C-Atom die S-  
Konfiguration aufweist.
19. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1, 2, 6 oder 7,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß R<sup>2</sup> ein Fettsäureester mit 10 bis 17 C-Atomen ist.
20. Verbindungen nach Anspruch 19,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß das den Fettsäureester aufweisende C-Atom die R-  
Konfiguration aufweist.
21. Verbindungen nach Anspruch 19,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß das den Fettsäureester tragende C-Atom die S-Konfi-  
guration aufweist.
22. Verfahren zur Herstellung von Phosphoverbindungen nach  
einem der Ansprüche 1 bis 21 durch Umsetzen von
- Isopropyliden-Glycerinaldehyd mit einer Triphenyl-  
phosphinalkylbromid-Verbindung mittels einer Wit-  
tigreaktion,
  - einer Hydrierung und Deacetonierung des so erhalte-  
nen Produktes auf an sich bekannte Weise, an-  
schließend
  - Tritylierung des hydrierten und deacetonierten  
Produktes zur entsprechenden O-Tritylhydroxy-Ver-  
bindung,



- 53 -

- Umsetzen der O-Tritylhydroxy-Verbindung und Detritylierung zum entsprechenden Hydroxy-O-Benzylzwischenprodukt und

Weiterverarbeitung des Zwischenproduktes entweder dadurch, daß man es

- durch Phosphorylierung zur entsprechenden Phospho-O-Benzylverbindung mit anschließender Debenzylierung zum entsprechenden O-Phospho-Hydroxy-Produkt umsetzt oder

daß man das Zwischenprodukt durch eine

- Phthalimideinführung mit Konformationsumkehr und anschließender Detritylierung zur entsprechenden Hydroxy-N-Phthalimido-Verbindung umsetzt, die dann mittels einer Phosphorylierung auf an sich bekannte Weise in die entsprechende Phospho-N-Phthalimido-Verbindung umgesetzt wird, und diese dann durch Phthalsäureabspaltung in das gewünschte O-Phospho-Amino-Produkt überführt wird.

23. Verfahren nach Anspruch 22,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man das Phosphocholin- oder das Phospho-(N,N-dimethyl)-Ethanolamin-Amino bzw. das entsprechende Hydroxy-Produkt mit einem den Rest R<sup>4</sup> enthaltenden Acetylierungsmittel zum entsprechenden Endprodukt umsetzt.

24. Verfahren nach Anspruch 22,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß eine 1-O-Trityl-2-hydroxyverbindung durch Allylierung und Detritylierung zur 1-Hydroxy-2-O-allyl-Verbindung umgesetzt wird, nach Benzylierung des Zwischenprodukts in 1-Position und Allyletherspaltung in 2-Position die freie 2-Hydroxylgruppe acyliert wird und die freie 1-Hydroxylgruppe durch Benzyletherspaltung

erzeugt wird und durch Phosphorylierung in die gewünschten Phosphorsäureester- und Phosphorsäurediester-Verbindungen überführt wird.

25. Verfahren nach Anspruch 22,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß eine 1-O-Trityl-2-hydroxy-Verbindung durch Einführung der Phthalimidgruppe unter Konfigurationsumkehr und anschließende Detritylierung zur entsprechenden 1-Hydroxyverbindung umgesetzt wird, das Zwischenprodukt anschließend durch eine Benzylierung in 1-Position gefolgt von einer Phthalsäureabspaltung in 2-Position zur 1-O-Benzyl-2-Aminoverbindung umgesetzt wird, die mit einem den Rest  $R^4$  enthaltenden Acylierungsmittel in die 1-O-Benzyl-2-N-Acyl-Verbindung umgewandelt wird und durch Debenzylierung die 1-Hydroxylgruppe freigelegt wird und durch Phosphorylierung in die gewünschten Phosphorsäureester- und Phosphorsäurediester-Verbindungen überführt wird.
26. Verfahren nach Anspruch 22,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß die 1-Hydroxy-2-O-Benzylverbindung in der 1-Position mit einem den Rest  $R^4$  enthaltenden Acylierungsmittel umgesetzt wird, durch Benzyletherspaltung die 2-Hydroxylgruppe freigelegt wird und durch Phosphorylierung in die gewünschten Phosphorsäureester- und Phosphorsäurediester-Verbindungen umgewandelt wird.
27. Verfahren nach Anspruch 22,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß die 1-Hydroxy-2-O-Benzylverbindung durch Mesylierung und anschließende Reaktion mit Ammoniak in die entspre-

chende 1-Aminoverbindung umgewandelt wird, nach Acylierung mit einem den Rest  $R^4$  enthaltenden Acylierungsmittel die 2-Hydroxylgruppe durch Debenzylierung freigesetzt wird und die freie 2-Hydroxylgruppe durch Phosphorylierung in die gewünschten Phosphorsäureester- und Phosphorsäurediester-Verbindungen überführt wird.

28. Verfahren nach Anspruch 24,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß die 1-Hydroxy-2-O-Allylverbindung in die 1-Phthalimidverbindung umgewandelt wird, nach Abspaltung der Allylschutzgruppe die freie 2-Hydroxylgruppe durch Phosphorylierung in die gewünschten Phosphorsäureester- und Phosphorsäurediester-Verbindungen umgewandelt wird, wobei durch Abspaltung von Phthalsäure die 1-Aminofunktion freigelegt werden kann.
29. Verfahren nach Anspruch 24,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß die 1-O-Benzyl-2-Hydroxy-Verbindung durch Phosphorylierung in die gewünschten Phosphorsäureester- und Phosphorsäurediester-Verbindungen umgewandelt wird, wobei durch Debenzylierung die 1-Hydroxy-Funktion freigelegt werden kann.
30. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens eine Phosphoverbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 21 oder hergestellt nach einem Verfahren der Ansprüche 22 bis 29 als Wirkstoff.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No  
PCT/EP 93/02762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 C07F9/09 A61K31/66 C07F9/117

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 C07F A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,4 659 859 (ROSANNE BONJOUKLIAN) 21 April 1987 see the whole document ---	1,2, 22-30
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 19, 5 November 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 170033, see abstract & MOL. IMMUNOL. vol. 27, no. 5, 1990 pages 405 - 412 COONEY, S.J. 'Combining site specificities of rabbit antibodies to platelet-activating factor (PAF)' --- -/--	1,2,14, 22-29

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 January 1994

Date of mailing of the international search report

20. 01. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Beslier, L

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No  
PCT/EP 93/02762

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY vol. 29, no. 12 , 1986 , WASHINGTON US pages 2472 - 2477 ROSANNE BONJOUKLIAN 'Studies of the antitumor activity of (2-alkoxyalkyl)- and (2-alkoxyolkenyl)phosphocholines' ----	1,2,30
X	EP,A,0 121 088 (A. NATTERMANN & CIE GMBH) 10 October 1984 see the whole document ----	1,2,30
X	EP,A,0 092 190 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 26 October 1983 see the whole document ----	1,2,30
X	EP,A,0 100 499 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 15 February 1984 see the whole document ----	1,2,30
X	US,A,4 640 913 (ALLAN WISSNER) 3 February 1987 see the whole document ----	1,2,30
X	DE,A,33 04 870 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 16 August 1984 see the whole document ----	1,2,30
A	US,A,5 144 045 (ALLAN WISSNER) 1 September 1992 see the whole document -----	1,30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 93/02762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4659859	21-04-87	JP-A- 61024530	03-02-86
EP-A-0121088	10-10-84	DE-A- 3307925	06-09-84
		JP-A- 59170097	26-09-84
		US-A- 4610979	09-09-86
EP-A-0092190	26-10-83	JP-A- 58189191	04-11-83
		US-A- 4562179	31-12-85
EP-A-0100499	15-02-84	JP-A- 59042394	08-03-84
		US-A- 4585762	29-04-86
US-A-4640913	03-02-87	NONE	
DE-A-3304870	16-08-84	NONE	
US-A-5144045	01-09-92	US-A- 5208223	04-05-93

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02762

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 5 C07F9/09 A61K31/66 C07F9/117

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 5 C07F A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US,A,4 659 859 (ROSANNE BONJOUKLIAN) 21. April 1987 siehe das ganze Dokument ---	1,2, 22-30
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 19, 5. November 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 170033, siehe Zusammenfassung & MOL. IMMUNOL. Bd. 27, Nr. 5, 1990 Seiten 405 - 412 COONEY, S.J. 'Combining site specificities of rabbit antibodies to platelet-activating factor (PAF)' --- -/--	1,2,14, 22-29

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nabeliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Januar 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20. 01. 94

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Beslier, L

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY Bd. 29, Nr. 12, 1986, WASHINGTON US Seiten 2472 - 2477 ROSANNE BONJOUKLIAN 'Studies of the antitumor activity of (2-alkoxyalkyl)- and (2-alkoxyolkenyl)phosphocholines' ----	1,2,30
X	EP,A,0 121 088 (A. NATTERMANN & CIE GMBH) 10. Oktober 1984 siehe das ganze Dokument ----	1,2,30
X	EP,A,0 092 190 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 26. Oktober 1983 siehe das ganze Dokument ----	1,2,30
X	EP,A,0 100 499 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 15. Februar 1984 siehe das ganze Dokument ----	1,2,30
X	US,A,4 640 913 (ALLAN WISSNER) 3. Februar 1987 siehe das ganze Dokument ----	1,2,30
X	DE,A,33 04 870 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 16. August 1984 siehe das ganze Dokument ----	1,2,30
A	US,A,5 144 045 (ALLAN WISSNER) 1. September 1992 siehe das ganze Dokument -----	1,30



**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**  
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
**PCT/EP 93/02762**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-4659859	21-04-87	JP-A- 61024530	03-02-86
EP-A-0121088	10-10-84	DE-A- 3307925 JP-A- 59170097 US-A- 4610979	06-09-84 26-09-84 09-09-86
EP-A-0092190	26-10-83	JP-A- 58189191 US-A- 4562179	04-11-83 31-12-85
EP-A-0100499	15-02-84	JP-A- 59042394 US-A- 4585762	08-03-84 29-04-86
US-A-4640913	03-02-87	KEINE	
DE-A-3304870	16-08-84	KEINE	
US-A-5144045	01-09-92	US-A- 5208223	04-05-93

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**